Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos
Área de Biologia Celular e Molecular

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL
DE INFEÇÃO SUBCUTÂNEA POR
VÍRUS OROPOUCHE EM HAMSTER**

Alcir Humberto Rodrigues

Ribeirão Preto

2004

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL
DE INFEÇÃO SUBCUTÂNEA POR
VÍRUS OROPOUCHE EM HAMSTER**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto -
USP para obtenção de título de Mestre em
Ciências – Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular.

Aluno: Alcir Humberto Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda

Ribeirão Preto

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Rodrigues, Alcir Humberto

Desenvolvimento de um modelo experimental de infecção
subcutânea por vírus oropouche em hamster.

67p. : il. ; 31cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP – Departamento de Biologia Celular,
Molecular e Bioagentes Patogênicos.

Orientador: Arruda, Eurico.

1.- Vírus Oropouche 2.- Arbovírus 3.- Patogênese de
bunyavirus

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Miguel e Dinha, pelo apoio incondicional e pela prontidão que sempre tiveram quando precisei, e quando não. Devo a eles não só a dádiva da vida, mas também minha educação e a base do meu caráter, caráter no qual faz um homem ser honrado.

Agradecimento especial

*Ao meu orientador, **Professor Doutor Eurico de Arruda Neto**, que sempre procurou,
através de seu perfeccionismo e competência,
oferecer a melhor perspectiva diante das dificuldades.*

Muito Obrigado Professor!

Agradecimentos

Aos Professores Doutores Aramis, Luiz Tadeu e Marcos Rossi, pela colaboração e sugestões importantes para o engrandecimento do meu trabalho.

À Cristina Ide Fujinaga pelo incentivo imprescindível, paciência budista e carinho angelical.

A todos da minha família, que acompanharam tudo de perto: meus irmãos Ivan (e Cristina) Juliana (e Noroel), minhas avós Ana e Leonilda, ao meu primeiro e único sobrinho Rodolfo, meus tios e tias, primos e primas que não vou especificar, pois são muitos.

A todos do meu laboratório que me auxiliaram e ensinaram tanto, e que até mesmo me fizeram rir nas horas em que eu tinha mais vontade de chorar ou de trucidar alguém:

Maria Lúcia (Pitty), Rodrigo (A-A-A-migão), Humberto (Rei do gado), Rogério (Carioca), Mânlio Tasso (O alquimista, caçador de gnomos, que foi abduzido), Reginaldo (Horse), Izolete (Zozô), Camilo (o primeiro pós-Doc.), Vanessa (Menina maluquinha), Tarcísio Amâncio, Ana Elise, Letícia, Flávia, Andrei (Pô cara!), Marco Aurélio (e o queijo?), Marisa, Miriã e Talita.

Aos Professores Doutores Cláudia Maffei, Marcelo Brocchi e Maria Célia Jamur pelos ensinamentos e pela paciência que tiveram comigo.

Ao pessoal do Laboratório Tadeu, que sempre estiveram à disposição quando precisei:

Soraia, Vitor Hugo, Marquinhos, Aldo, Ricardo, Pink (Márcia),

Viviane, Roberta, Mário e Ellen.

Ao pessoal laboratório do Prof. Marcelo Brocchi, pela força nas horas difíceis: Ita,

Juliana (do Lenaldo), José Luiz (Zé), Gustavo, Dan, Isabela (Bela) e André(s).

Ao pessoal laboratório do Prof. Benedito pelas dicas: Sérgio, Maria Teresa e Cléber.

Aos amigos de Departamento e Corredores que ajudaram a fazer da pós um ambiente

familiar: Maristela, Fabrício, Trança (Leandro), Émerson, Rodrigo (Smoo),

Gabriel (gaúcho), Pryscilla, Fabiana Matioli, Daniela Dover, Camila, Camile, Liliana,

Lucinha, Eduardo Dantas, Homer, Sandro, Choco, Luiz Ferrari e Pancinha e etc...

Aos funcionários do Departamento: Lúcia, Rosângela e Ana (secretárias), Vani

(técnica), Izilda (técnica), Domingos (bioterista),

Dona Lúcia (limpeza), Dona Inês (da esterilização).

Ao pessoal do futebol, pelos momentos de lazer: Ademílson, Cacá, Carlos, Daniel

(Collor), Deílson, Guará (Presidente dos rodinhos sem borracha) Gustavo, Luciano,

Professor Benedito, Rubinho, Eduardo; e ao pessoal do futebol de Sábado:

Fernando (Fernadex), Rogério (Wimbe) e Peludo.

Ao casal de amigos, que considero irmãos e que me adotaram: Hélder e Gisele.

Aos meus amigos e irmãos dos tempos de Faculdade (Odonto-Araraquara-UNESP); que
sempre me incentivaram: Renatão, Roger, Elias, Goianinho,
Delucca, Gustavo (Maçã), Lenaldo e Márcia.

Aos meus amigos de Orlândia, que acompanharam toda minha trajetória:
Leandro, Ronaldinho Machado e Márcio (Véio).

Aos meus amigos de cachaça: Wilken (will can dance),
Marquinhos (Marquinho Douglas) e Hermes (Mano).

(In memoriam) ao genial Wolfgang Amadeus Mozart (1756-1791) que me acalentou, com
suas obras primas, nas horas em que escrevia esta dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela
concessão de bolsa de mestrado – demanda social e à Fundação de Amparo à Pesquisa
do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Desculpem me pelo esquecimento de alguém!

Sumário

Resumo	
Summary	
Introdução	1
Epidemiologia.....	3
Ciclo de transmissão.....	5
Agente etiológico.....	6
Febre do oropouche: manifestações clínicas.....	11
Patogênese.....	14
Achados laboratoriais complementares.....	15
Diagnóstico laboratorial.....	16
Diagnóstico diferencial.....	17
Modelos animais.....	18
Objetivo	21
Material e métodos	23
Propagação e preparo do estoque de vírus Oropouche.....	24
Infecção dos hamsters.....	24
Sacrifício dos animais.....	25
Análise do sangue.....	25
Quantificação de vírus nos órgãos coletados.....	26
Imunofluorescência para confirmação da quantificação viral.....	27
Análise histológica.....	28
Resultados	36
Manifestações clínicas dos hamsters infectados com o vírus Oropouche.....	37
Títulos de vírus nos órgãos.....	39
Achados histopatológicos.....	40
Detecção por imunohistoquímica do vírus Oropouche.....	44
Discussão	51
Conclusões	59
Referências bibliográficas	61

Lista de figuras

Figura 1	Estrutura dos vírions da família <i>Bunyaviridae</i>	8
Figura 2	Ciclo replicativo provável da família <i>Bunyaviridae</i>	10
Figura 3	Evolução do peso dos hamsters com sinais graves da doença.....	37
Figura 4	Evolução da temperatura de 8 hamsters inoculados com vírus ORO..	38
Figura 5	Títulos do vírus Oropouche em: cérebro, fígado e plasma.....	39
Figura 6	Imunofluorescência positiva para Oropouche.....	40
Figura 7	Controle negativo (campo claro).....	40
Figura 8	Controle negativo (campo escuro).....	40
Figura 9	Histologia do cérebro de hamster não infectado.....	41
Figura 10	Meningocefalite após 7 dias de infecção.....	41
Figura 11	Foco de encefalite após 7 dias de infecção.....	42
Figura 12	Cérebro de hamster após 7 dias de infecção.....	42
Figura 13	Histologia do fígado de hamster não infectado.....	43
Figura 14	Lesão hepática após 7 dias de infecção.....	43
Figura 15	Cérebro não infectado	44
Figura 16	Cérebro não infectado.....	44
Figura 17	Cérebro infectado com Oropouche após 4 dias.....	45
Figura 18	Cérebro infectado com Oropouche após 4 dias.....	45
Figura 19	Cérebro infectado com Oropouche após 5 dias.....	46
Figura 20	Cérebro infectado com Oropouche após 5 dias.....	46
Figura 21	Cérebro infectado com Oropouche após 5 dias.....	47
Figura 22	Cérebro infectado com Oropouche após 11 dias.....	47
Figura 23	Cérebro infectado com Oropouche após 11 dias.....	47
Figura 24	Cérebro infectado com Oropouche após 13 dias.....	48
Figura 25	Cérebro infectado com Oropouche após 13 dias.....	48
Figura 26	Fígado não infectado.....	49
Figura 27	Fígado infectado com Oropouche após 8 dias.....	49

RESUMO

O vírus Oropouche pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu, e é segunda causa mais freqüente de arbovirose febril no Brasil. Estima-se que mais de meio milhão de casos de febre do Oropouche tenham ocorrido no Brasil nos últimos 30 anos, havendo também ocorrências no Panamá, Peru, Suriname e Trinidad. Epidemias de febre do Oropouche têm sido registradas quase que exclusivamente na Amazônia. Porém, com o aquecimento global do planeta, desmatamentos e conseqüente redistribuição de insetos vetores e animais reservatórios, há risco de disseminação de vírus Oropouche para outras regiões do Brasil e da América do Sul. A patogenia da infecção por Oropouche não é bem entendida. Modelo em roedores, usando inoculação intracerebral, tem sido descrito, mas não com uso da via subcutânea, que mais se assemelha à rota natural da infecção. O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar um modelo experimental de infecção com Oropouche, usando inoculação subcutânea em hamster, a fim de contribuir para o entendimento da patogenia do mesmo. Oropouche da linhagem BeAn19991, passado em cérebro de camundongo recém-nascido, foi inoculado ($10^{6,25}$ TCID₅₀/100μL) por via subcutânea na coxa de hamsters sírios com 2-3 semanas de idade. Em torno de 3 dias alguns animais desenvolveram doença com sinais clínicos brandos caracterizados por: eriçamento dos pêlos e agressividade, outros com características mais graves: perda de peso, tremores sugestivos de calafrios, letargia e paralisia. Os animais foram sacrificados 1, 3, 5, 8 e 11 dias pós-inoculação ou quando eram encontrados em estado agônico. Baço, cérebro, coração, fígado, músculo e sangue foram colhidos para titulação viral, histologia e imunohistoquímica. Infiltrado inflamatório estava presente no cérebro, principalmente em torno dos vasos, meninges e discretamente no coração. O vírus Oropouche foi detectado no tecido cerebral ($10^{7,23}$ TCID₅₀/g), no fígado ($10^{6,67}$ TCID₅₀/g) e no sangue (10^6 TCID₅₀/g). Antígeno de Oropouche foi encontrado, difusamente no fígado, associado com hepatócitos e em neurônios de diversos locais do cérebro. Este modelo reproduz uma infecção sistêmica por Oropouche e pode tornar-se útil no estudo da patogênese, bem como para testar drogas antivirais e possíveis candidatos a vacina.

Palavras-chave: vírus oropouche; arbovírus; patogênese de bunyavirus.

SUMMARY

Oropouche virus belongs to the family *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*, serogroup Simbu and is the second most frequent arboviral febrile illness in Brazil. There are estimates of more than half million cases of Oropouche fever in Brazil in the past 30 years, with cases registered in Panama, Peru, Suriname and Trinidad. Oropouche fever has been registered almost exclusively in the Amazon, but with the global warming, deforestation and the consequent redistribution of vectors and reservoir animals, the risk of Oropouche virus dissemination to others areas of Brazil and South America increases. However, the pathogenesis of Oropouche infection is not well understood. Rodent models using intracerebral inoculation have been described, but no attempts to use a route that more closely resembles the natural route of infection have been published. This study was conducted to establish and characterize an experimental model of infection with Oropouche, using subcutaneous inoculation of hamsters, in order to contribute to the understanding of Oropouche pathogenesis. We have established an experimental model through subcutaneous inoculation of hamsters in order to study pathogenesis. Suckling mouse brain passaged Oropouche strain BeAn19991 was inoculated ($10^{6.25}$ TCID₅₀/100 μ L) subcutaneously in the thigh of syrian hamsters 2-3 weeks old. Around day 3 animals developed disease characterized by lethargy, paralysis, chill-like shaking and ruffled fur. Animals were sacrificed on days 1, 3, 5, 8 and 11 post-inoculation or whenever found to be agonic. Brain, heart, liver, spleen, muscle and blood were harvested for virus titration, histology and Oropouche immunohistochemistry. Inflammatory infiltrate was present in the brain, mostly as perivascular cuffs, meninges and some in the heart. Oropouche titers were $10^{7.23}$ TCID₅₀/g of tissue in brain $10^{6.67}$ TCID₅₀/g in liver, and 10^6 TCID₅₀/g in blood. Oropouche antigen was detected diffusely distributed in the liver in association with hepatocytes, and in neurons in several regions of the brain. This model reproduces systemic Oropouche infection and may become useful in pathogenesis studies, as well as to test antiviral drugs and possible vaccine candidates.

Key words: oropouche virus; arbovirus; bunyavirus pathogeneses.

Vírus da família *Bunyaviridae* ocupam destacada posição entre os agentes causadores de doenças infecciosas emergentes (GUBLER, 1998). Entre os membros dessa família destacam-se os Hantavírus, causadores de doenças febris e severas síndromes pulmonares com hipotensão, e o arbovírus Oropouche, importante causa de doença febril no nosso país (GUBLER, 1998; SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). O vírus Oropouche se destaca pelo elevado número de casos de infecção aguda febril, que ocorrem em surtos epidêmicos em áreas urbanas da Amazônia, bem como pelo seu potencial de disseminação para áreas urbanas infestadas pelo inseto vetor (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001; PINHEIRO et al., 1997).

A febre do Oropouche é freqüentemente destacada como um exemplo de zoonose viral emergente, cuja freqüência tem crescido em decorrência do desmatamento e da criação de novas fronteiras agropecuárias (MURPHY, 1998; GIBBONS, 1993). O vírus Oropouche é o arbovírus que mais freqüentemente causa epidemias de doença febril na Amazônia e é a segunda causa mais freqüente de arbovirose urbana no Brasil, depois da dengue. Estima-se em mais de meio milhão o número de casos ocorridos no Brasil nos últimos 30 anos (PINHEIRO et al., 1997). O verdadeiro impacto do vírus Oropouche na Amazônia deve ser maior, pois o caráter inespecífico da doença febril pode levar a subestimar sua freqüência. Inquéritos sorológicos efetuados em períodos não epidêmicos têm revelado freqüências de soropositividade para Oropouche entre 0 e 10,7% em diferentes subpopulações amazônicas (PINHEIRO et al., 1997).

Epidemiologia

O primeiro caso da doença foi descrito em Trinidad em 1955, em um residente de Vega de *Oropouche*, de cujo sangue foi isolado o agente (ANDERSON et al., 1961). No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em 1960, do sangue de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) e de um “pool” de *Aedes serratus* capturados nas margens da rodovia Belém-Brasília (PINHEIRO et al., 1962).

A doença foi detectada novamente em 1961, desta vez na cidade de Belém-PA, onde causou uma epidemia que afetou, no mínimo 11.000 pessoas (PINHEIRO et al., 1962). Esta epidemia foi seguida pela ocorrência de muitas outras, algumas de natureza explosiva, em centros populacionais urbanos nos estados brasileiros do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Tocantins e Rondônia (PINHEIRO et al., 1962; PINHEIRO et al., 1976; LEDUC et al., 1981; PINHEIRO et al., 1981b; FREITAS et al., 1982; VASCONCELOS et al., 1989; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996; PINHEIRO et al., 1998). Além do Brasil, há registros de ocorrências de infecção por vírus Oropouche no Panamá, Peru, Suriname e Trinidad (VAN TONGEREN, 1967; TESH, 1994; WATTS et al., 1997).

Com a abertura de novas fronteiras agrícolas, há a possibilidade de redistribuição de insetos vetores e reservatórios silvestres, com conseqüente risco de disseminação do vírus para outras áreas. Seriam potenciais áreas de risco aquelas próximas de regiões costeiras onde há mangues e onde maruins são abundantes, como é o caso de Salvador, Bahia (SHERLOCK & GUITON, 1964).

Com poucas exceções, todas ocorrências publicadas da febre do Oropouche têm sido na forma de epidemia urbana, incluindo aquelas de Belém e Manaus, as maiores cidades da região Amazônica brasileira. De 1961 a 1996, mais de 30

epidemias da febre do Oropouche foram registradas no Brasil. A cidade de Belém, capital do estado do Pará, foi atacada pelas três maiores epidemias dos últimos 20 anos. A cidade de Santarém, e vilas próximas, também foram afetadas por grande epidemia em 1974 e 1975 (DIXON et al, 1975; PINHEIRO et al.,1976). As primeiras epidemias registradas fora do estado do Pará foram relatadas no início na década de 1980, notavelmente nas cidades de Manaus e Barcelos no estado do Amazonas (BORBOREMA et al., 1982) e a cidade de Mazagão, que pertence ao território do Amapá (PINHEIRO, 1983). Em 1988, novas epidemias da doença foram registradas nas cidades de Porto Franco e Tocantinópolis, respectivamente nos estados do Maranhão e Tocantins (VASCONCELOS et al., 1989). Em 1991, ocorreram novos surtos, desta vez em localizações mais distantes como Ariquemes e Ouro Preto D' Oeste no estado de Rondônia (PINHEIRO et al., 1994).

Em 1994, outra epidemia envolvendo no mínimo 6.000 pessoas, foi registrada em Serra Pelada, PA (TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996). A última epidemia foi registrada em 1996, afetando no mínimo cinco centros urbanos nos estados do Pará, Amazonas e Acre (PINHEIRO et al., 1998). Tem-se determinado por exames sorológicos, que mais de 357.000 pessoas foram infectadas pelo vírus Oropouche entre 1961 e 1996 (PINHEIRO et al., 1981b; BORBOREMA et al., 1982; FREITAS et al., 1982; PINHEIRO et al., 1986). Contudo, esta é claramente uma subestimativa. É possível que mais de meio milhão de pessoas na região Amazônica brasileira tenham sido infectadas com o vírus Oropouche desde o início da década de 1960.

Na região Sudeste também foram notadas evidências de circulação do vírus Oropouche. Testes sorológicos de inibição de hemaglutinação, neutralização e fixação do complemento, realizados na cidade e região de Ribeirão Preto, para

conhecer os níveis de anticorpos para arbovírus demonstraram a presença de anticorpos contra Oropouche, ainda com baixa incidência: 1%. (FIGUEIREDO et al., 1986). Em 2001 vírus Oropouche da cepa de referência BeAN 626998, foi isolado de uma amostra do fígado de um macaco encontrado morto no Estado de Minas Gerais. (NUNES et al., 2002).

Fora do Brasil, epidemias foram relatadas no Panamá e no Peru. A epidemia no Panamá ocorreu em 1989 na vila de Bejuco, 50 quilômetros a oeste da capital (QUIROZ e colaboradores, Panamá, dados não publicados apud PINHEIRO et al., 1998). A primeira epidemia no Peru foi relatada em 1992 na cidade de Dios, também na região amazônica (CHAVEZ et al., 1992). Estudos feitos no Peru indicam que a transmissão do vírus Oropouche ocorre continuamente na população da cidade de Iquitos e nas vilas próximas (WATTS et al., 1997). Evidência de imunidade contra o vírus Oropouche foi detectada em primatas não humanos na Colômbia, sugerindo a presença do vírus naquele país (KARABATSOS, 1985).

Ciclo de transmissão

O vírus Oropouche ocorre na natureza em dois ciclos distintos: silvestre e urbano. O ciclo silvestre silencioso é responsável pela manutenção do vírus e vários achados apontam preguiças e macacos como seus principais hospedeiros vertebrados, embora certas espécies de aves silvestres possam ser hospedeiros alternativos. Pouco se conhece, entretanto, quanto aos transmissores desse arbovírus em ambiente silvestre. No ciclo urbano, são assinaladas duas espécies de insetos como vetores do vírus Oropouche: o maruim *Culicoides paraensis* é o vetor primário e o mosquito *Culex p. quinquefasciatus* é um vetor secundário (PINHEIRO et al., 1981b). Estudos

efetuados com hamsters demonstraram que maruins são mais eficazes na transmissão. A prova decisiva do papel do *C. paraensis* como vetor urbano do vírus Oropouche foi obtida no Instituto Evandro Chagas (Belém-PA) pela transmissão do agente de homem para hamster através da picada do maruim. Ficou assim demonstrado, pela primeira vez no mundo, que maruins podem atuar como transmissores de arboviroses humanas de importância em saúde pública (PINHEIRO et al., 1982b). Esses minúsculos insetos são ativos durante o dia, especialmente no final da tarde, e têm grande avidez por sangue humano, picando pessoas tanto fora como dentro das casas. Procriam em matéria orgânica vegetal em decomposição, como cascas de cacau, troncos cortados de bananeira e, possivelmente, em outros tipos de vegetais (HOCK et al., 1986) e detritos acumulados em depressões de árvores (LINLEY et al., 1983). São amplamente disseminados em áreas tropicais e subtropicais das Américas (LINLEY et al., 1983) e estão presentes em densidade elevada em muitas localidades da Amazônia, mas sua presença já foi documentada em outras áreas do país, como Salvador (SHERLOCK et al., 1964). O elo entre o ciclo silvestre e o urbano parece ser o próprio homem, que após contrair a infecção em áreas florestais enzoóticas, regressa em estado virêmico à cidade, e infecta o *C. paraensis*. (TRAVASSOS DA ROSA, 1998).

Agente etiológico

O vírus Oropouche pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthonyavirus*, sorogrupo Simbu (PINHEIRO et al., 1994). Este sorogrupo é definido por antígenos comuns fixadores do complemento, contém mais de 24 vírus diferentes, dentre os

quais descam-se os vírus Oropouche (KINNEY & CALISHER, 1981) e Jatobal (FIGUEIREDO & TRAVASSOS DA ROSA, 1988) como patógenos humanos

A família *Bunyaviridae* é composta por cinco gêneros: *Hantavirus*, *Orthobunyavirus* (onde se inclui o vírus Oropouche), *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2004). O gênero *Orthobunyavirus* é composto por 16 sorogrupos, sendo os sorogrupos Bunyamwera, Simbu e Califórnia os mais importantes em saúde pública (NICHOL, 2001).

Análise filogenética revelou que todas as cepas disponíveis do vírus Oropouche formam um grupo monofilogenético, que compreende três tipos distintos. Tipo I contendo o protótipo de Trinidad e a maioria dos sorotipos brasileiros, tipo II contendo seis sorotipos peruanos isolados entre 1992 e 1998, e dois sorotipos do oeste brasileiro isolados em 1991, enquanto o tipo III compreende quatro sorotipos isolados do Panamá durante 1989 (SAEED et al., 2000).

Os vírus do gênero *Orthobunyavirus* são esféricos, têm de 80 a 120 nm de diâmetro, exibem glicoproteínas de superfície em projeções de 5 a 10 nm, as quais estão inseridas numa bicamada de lipídios com 5 a 7 nm de espessura, formando o envoltório do vírus. Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica do *Orthobunyavirus* La Crosse sugerem que existem de 270 a 1400 espículas de glicoproteínas por vírus. Estas espículas são constituídas de heterodímeros das glicoproteínas de superfície G1 e G2 (à exceção dos *Nairovirus*) (NICHOL, 2001). A composição e a estrutura dos vírions foi inferida por estudos bioquímicos e morfológicos. O vírus Uukuniemi, por exemplo, possui 2% de RNA, 58% de proteína, 33% de lipídio e 7% de carboidrato (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001).

Todos os vírus dessa família possuem RNA tri-segmentado de polaridade negativa, com exceção dos *Phlebovirus* e *Tospovirus*, que têm um dos segmentos de RNA ambisense (NICHOL, 2001). Os segmentos são nomeados de acordo com o seu tamanho: segmento grande (L, de ‘large’), segmento médio (M) e segmento pequeno (S, de ‘small’) (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). Há significativa semelhança entre os *Orthobunyavirus* no que concerne aos tamanhos dos segmentos de RNA (USHIJIMA et al., 1980), que por sua vez são diferentes dos observados em outros membros da família *Bunyaviridae* (Figura 1).

Figura 1. Estrutura dos vírions da família *Bunyaviridae*. Esquema de uma seção através do vírus (Schmaljohn & Hooper, 2001).

Os segmentos S, M e L de RNA são replicados e traduzidos através de diferentes estratégias. Essas estratégias variam entre os *Bunyaviridae*, podendo haver variações inclusive entre vírus do mesmo gênero. Para os *Orthobunyavirus* “snowshoe hare” (sorogrupo Califórnia) e Germiston (sorogrupo Bunyamwera), o segmento S possui nucleotídeos que codificam uma proteína de 26,5 Kd, que é componente do capsídeo (N) e uma proteína não estrutural (NS), ambas traduzidas por sobreposição de “open reading frames” (ORF) (CASH et al., 1979; BOULOY et

al., 1984; SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). De modo semelhante ao segmento S, o segmento M codifica proteínas estruturais e não estruturais, porém sem sobreposição de ORFs. Uma poliproteína é traduzida a partir do segmento M e clivada co-traducionalmente em proteínas estruturais G1 (108-125 Kd) e G2 (29-41 Kd) e uma proteína não estrutural (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). Em todos os gêneros da família *Bunyaviridae*, o segmento L consiste de aproximadamente 6500 nucleotídeos e codifica um polipeptídeo com 240-260 Kb, que tem função de RNA-polimerase (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001).

A interação vírus-célula dá-se pela união de proteínas do envoltório do vírus com receptores na membrana celular (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). Sabe-se que para vários *Hantavirus*, os receptores são β_3 -integrinas (GAVRILOVSKAYA et al., 1998; GAVRILOVSKAYA et al., 1999). No vírus La Crosse a proteína G1 do envoltório viral funciona como ligante de receptor em células de mamíferos, enquanto a proteína G2 é responsável pela entrada do vírus em células de insetos (LUDWIG et al., 1991).

O que se sabe do ciclo replicativo dos vírus da família *Bunyaviridae* foi baseado em estudos feitos com alguns vírus mais estudados dessa família, tais como La Crosse, Punta Toro, Hantaan e Uukuniemi. Com base nesses estudos o ciclo replicativo dos *Bunyaviridae* começa com o reconhecimento pelo vírus do receptor específico de membrana plasmática, seguindo-se endocitose. Recentemente foi descoberto que a entrada do vírus Oropouche, tanto em células HeLa quanto C6/36, é mediada por endocitose dependente de clatrina e ocorre entre 15 e 20 minutos após adsorção. E que, em células Hela I, o desnudamento do vírus Oropouche é dependente de acidificação de endossomo (SANTOS, 2003). No endossomo, há

fusão da membrana celular com o envelope viral e, conseqüentemente, liberação do ribonucleocapsídeo no citoplasma, o que permite a transcrição primária das fitas de RNA negativas em fitas positivas, que serão usadas na tradução de proteínas virais (mRNA) e servirão de molde (cRNA) para transcrição do RNA viral (vRNA). O brotamento dos vírus da família *Bunyaviridae* dá-se no complexo de Golgi (SMITH & PIFAF, 1982; SCHMALJOHN & HOOPER, 2001), com exceção de alguns membros, como os hantavirus Sin Nombre e Black Creek Canal, que brotam da membrana plasmática (RAVCOV et al., 1997; SCHMALJOHN & HOOPER, 2001). O ciclo replicativo do vírus Oropouche dura entre 22 e 28 horas com eficiência replicativa de cerca de 1000 partículas de progênie para cada partícula inicial, em células HeLa (SANTOS, 2003). Os estudos publicados indicam que os vírus da família *Bunyaviridae* em sua maioria saem da célula por exocitose (figura 2) (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001).

Fig. 2. Ciclo replicativo provável da família *bunyaviridae*, com base em estudos feitos com os vírus mais estudados dessa família (Schmaljohn & Hooper, 2001).

Apesar da sua importância em saúde pública, pouco se sabe sobre patogênese a nível molecular e aspectos de interação vírus-célula de infecções por vírus Oropouche. A grande maioria dos dados conhecidos sobre patogênese de vírus do gênero *Orthobunyavirus* deriva de experimentos realizados com vírus La Crosse, que é o protótipo dos vírus do sorogrupo Califórnia. Sabe-se que o tropismo tissular é variável entre os vírus dessa família e isto se deve, pelo menos em parte, à distribuição de receptores (SCHMALJOHN & HOOPER, 2001).

Febre do Oropouche - Manifestações clínicas

Na maioria dos casos de febre do Oropouche, a infecção se manifesta na forma de episódios febris agudos. A forma febril clássica é caracterizada por um súbito ataque após o período de incubação, que varia de 4 a 8 dias. Os primeiros sintomas são febre, dor de cabeça, calafrios, vertigem, dor muscular, artralgias e fotofobia. Pode ocorrer também dor retro-ocular e congestão da conjuntiva. Alguns pacientes podem sofrer náusea, que pode ser acompanhada de vômito e diarreia. Alguns pacientes sofrem de severa anorexia e insônia. Algumas vezes, pacientes poderão ter tosse e coriza, mas essas manifestações podem ser devidas a infecções intercorrentes. Certos pacientes queixam-se de ardor passageiro em diferentes partes do seu corpo, mas a ocorrência de exantema é rara.

Duas mulheres, técnicas de laboratório, infectadas acidentalmente, relataram fluxo menstrual mais intenso e prolongado que o usual (PINHEIRO et al., 1976; PINHEIRO et al., 1981b; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996). A febre pode ser muito alta de 39°C a 40°C e em alguns casos até acima de 40°C. A dor de cabeça usualmente é severa e localizada na região frontal ou atrás da cabeça, mas também

pode ser difusa, e pode não responder prontamente a analgésicos comuns. Há forte mialgia generalizada aguda, na cabeça, ao longo da coluna vertebral e da região sacral. Usualmente, há também artralgia generalizada. Certos pacientes sofrem ataques de vertigem tão severos que, em alguns casos, causam queda. Pode haver epigastria leve, sem sinais de icterícia, hepatomegalia, ou esplenomegalia. Ocasionalmente, pode haver linfadenomegalias nas regiões submandibulares e occipital. (PINHEIRO et al., 1998). A intensidade dos sintomas clínicos varia, sendo em alguns casos bastante severos podendo causar prostração. Muitos pacientes são acamados e, em certas epidemias, acabam superlotando hospitais. (PINHEIRO et al., 1998).

A fase aguda da doença geralmente dura de 2 a 5 dias, mas pode durar uma semana. A mialgia, por outro lado, pode persistir de 3 a 5 dias depois do desaparecimento da febre. Alguns pacientes relatam astenia prolongada, com duração de um mês. Certos pacientes queixam-se de dor de cabeça persistente, que dura algumas semanas. Nenhuma morte foi relatada em consequência de infecção pelo vírus Oropouche (LEDUC & PINHEIRO, 1986).

Aproximadamente 60% dos pacientes sofrem uma ou mais recidivas durante o curso da primeira ou segunda semana depois do desaparecimento dos sintomas agudos da doença. (PINHEIRO et al., 1981b; FREITAS et al., 1982; PINHEIRO, 1983). Nas recidivas os sintomas podem ser os mesmos da fase aguda da doença ou podem limitar-se à febre, astenia e vertigem. Em alguns pacientes, as recidivas foram acompanhadas de infecção bacteriana do trato urinário e orofaringe, aproximadamente 10 dias após desaparecimento da condição febril original. Em

alguns casos, pacientes podem sofrer uma série de recidivas durante 2 a 3 semanas (PINHEIRO et al., 1981b).

Viremia é um achado praticamente universal nos dois primeiros dias de doença, mas declina rapidamente até o quinto ou sexto dias (PINHEIRO et al., 1981b). Todas as tentativas de se isolar o vírus Oropouche durante as recidivas falharam (PINHEIRO et al., 1998).

Observações feitas durante uma epidemia que ocorreu em Belém do Pará, em 1980, revelaram que em torno de 5% dos casos confirmados laboratorialmente, desenvolveram exantema (PINHEIRO, 1983). O exantema apareceu entre o terceiro e o sexto dias após o princípio da febre, desaparecendo 2 ou 3 dias mais tarde, e envolvendo principalmente tórax, dorso, braços e pernas (PINHEIRO, 1983; PINHEIRO et al., 1986). Durante epidemia em Manaus, muitos pacientes exibiram exantema máculo-papular, originando-se no dorso e subsequente estendendo-se às extremidades superiores e inferiores (BORBOREMA et al., 1982). Uma criança de 4 anos de idade, cuja infecção pelo vírus foi diagnosticada serologicamente apresentou nistagmo, tremor generalizado e sonolência (FREITAS et al., 1982). Estes sintomas duraram aproximadamente 8 dias e a criança, aparentemente, se recuperou totalmente.

Os efeitos da febre do Oropouche sobre as gestantes são desconhecidos. O único dado disponível a esse respeito vem de estudos conduzidos em Manaus, de nove pacientes grávidas, das quais duas, que estavam no segundo mês de gestação, sofreram aborto (BORBOREMA et al., 1982).

Durante um surto de febre do Oropouche, no estado do Pará em 1980, foi verificado que inúmeros pacientes apresentaram manifestações neurológicas típicas

de meningite asséptica no início da fase aguda da infecção. À medida que a doença progride, nos dias subsequentes, a dor de cabeça e a vertigem tornam-se cada vez mais severas e certos pacientes começam a ter outros sintomas neurológicos, chegando, ao ponto, de buscar cuidados médicos. No geral isto ocorre durante a segunda semana de doença. Aproximadamente um terço dos pacientes têm náusea e vômito; alguns sofrem letargia moderada e podem ter dificuldade em se manter na posição ereta. Certos pacientes queixam-se de diplopia. Em muitos casos, o exame físico revelou graus variados de rigidez da nuca, mas não foram encontradas parestesia ou paralisia. Alguns pacientes experimentaram nistagmo. Eletroencefalogramas não demonstraram anormalidades em quatro pacientes. A incidência de meningite, entre pacientes que procuraram cuidados médicos, foi de menos de 5% (PINHEIRO et al., 1982a).

Patogênese

Pouco se conhece sobre a patogênese da febre do Oropouche. O agente produz uma infecção sistêmica em humanos, com fase virêmica. Os títulos virais geralmente são mais altos que $10^{3,0}$ DL₅₀/0.02 mL e, em aproximadamente 10% dos pacientes, foram encontrados títulos virais de até $10^{5,0}$ a $10^{5,3}$ DL₅₀/0.02 mL nos dois primeiros dias da doença. Pelo terceiro dia, os títulos virais são um log₁₀ abaixo dos 2 primeiros dias, tornando-se negativos pelo quarto dia. Virtualmente todos pacientes infectados exibiram viremia durante os dois primeiros dias da doença. Pelo terceiro dia, a viremia baixa para 72 %, caindo para 44 e 23% , nos quarto e quinto dias, respectivamente (PINHEIRO et al., 1981b).

Do mesmo modo, pouco se sabe sobre a patogênese das recidivas comuns na febre do Oropouche. O fato de não haver sinais de viremia em vários pacientes com recidivas é digno de nota (PINHEIRO et al., 1998). O fato de que o vírus Oropouche é capaz de causar meningite asséptica combinado com ao de que foi isolado do fluido cérebro-espinhal em um caso de meningite, sugerem que o vírus tem a habilidade de penetrar as barreiras hematoencefálicas (PINHEIRO et al., 1982a). Como não são conhecidas fatalidades atribuídas ao vírus Oropouche, não há dados de autópsia disponíveis sobre possíveis lesões teciduais causadas por este agente em humanos (PINHEIRO et al., 1998). Não se sabe todos os órgãos nos quais o vírus se replica.

Achados laboratoriais complementares

Leucopenia associada com neutropenia é encontrada comumente ainda que, em certos casos, possa haver leucocitose moderada. A leucopenia pode ser severa, com até 2000 leucócitos por mm^3 . Os níveis de transaminases glutâmico-oxalacético e glutâmico-pirúvico são normais ou podem demonstrar um aumento moderado, mas sem exceder 135 por mL de soro. A contagem de plaquetas usualmente é normal, mas ocasionalmente pode estar ligeiramente baixa. As taxas de sedimentação e os níveis de uréia, creatinina e glicose no sangue são normais, assim como os testes de urina (PINHEIRO et al., 1981b).

O fluido cérebro-espinhal de 22 pacientes com meningite asséptica demonstrou pleocitose e um aumento na concentração de proteínas (PINHEIRO et al., 1982a). A contagem de células variou de 7 a 310 células por milímetro cúbico de fluido cérebro-espinhal; com presença tanto de células segmentadas quanto mononucleadas. Em um caso, a contagem de células do fluido cérebro-espinhal

decaiu de 130 para 30 no período de 1 semana, e em um outro a contagem de células decaiu de 70 para 10 células, em um intervalo de 3 semanas. No geral, há um aumento moderado dos níveis de proteína do fluido cérebro-espinhal, mas um paciente teve nível de proteínas aumentado a mais de 100mg/mL. Os níveis de glicose no sangue permaneceram normais (PINHEIRO et al., 1998).

Diagnóstico laboratorial

Confirmação da infecção por vírus Oropouche é feita por isolamento viral do sangue do paciente ou realizando testes sorológicos específicos para o vírus (PINHEIRO et al., 1994). A fim de isolar o vírus, as amostras de sangue precisam ser obtidas durante os primeiros 5 dias da doença, de preferência nos 2 primeiros dias, quando a viremia é máxima. O vírus pode ser isolado do soro de pacientes por meio de inoculações intracerebral ou intraperitoneal em camundongos recém-nascidos (1 a 3 dias) ou em hamsters jovens (2 a 3 semanas). Isolados virais podem ser obtidos em diferentes culturas de células, tais como Vero e BHK-21. O vírus isolado tem sido identificado por reação de fixação de complemento ou neutralização, usando fluido ascítico ou anti-soro específico para Oropouche.

O sorodiagnóstico é feito pela detecção de anticorpo em amostras de soros pareadas, obtidas durante a fase aguda e de convalescença da doença, usando inibição de hemaglutinação, fixação de complemento ou neutralização. Uma análise positiva de captura de anticorpo IgM, por reação enzimática (*MAC-ELISA*) sobre uma única amostra de soro fornece diagnóstico presuntivo de infecção recente,

particularmente na presença de quadro clínico compatível com a doença; o teste usualmente é positivo após o quinto dia da doença (PINHEIRO et al., 1998).

Outro método de imunoensaio enzimático (ELISA), utilizando uma proteína recombinante do nucleocapsídeo do vírus Oropouche, foi desenvolvido para facilitar a detecção do vírus. Este antígeno apresenta características de alta sensibilidade e especificidade em substituição ao vírus completo, facilitando o manejo e diminuindo riscos de contaminação e infecção (SAEED et al., 2001).

Além dos testes citados, atualmente existem outros, mais rápidos e sensíveis: os testes moleculares. Além da RT-Nested-PCR (MORELI et al., 2002), há um método de RT-PCR ainda mais sensível que apresenta níveis de detecção em torno de 10^4 a 10^1 partículas virais, podendo ser usado já no primeiro dia de doença (WEIDMANN et al., 2003).

Diagnóstico diferencial

Devido à natureza inespecífica dos sintomas, o diagnóstico clínico da febre do Oropouche é difícil e a doença é frequentemente confundida com outras doenças febris, tal como dengue e malária. De fato, malária ou dengue inicialmente foram suspeitas de serem a causa de epidemias de febre do Oropouche. Registros clínicos detalhados, combinados com dados epidemiológicos, podem ajudar a estabelecer o diagnóstico, pela ausência de *Plasmodium* nas amostras sanguíneas e de evidências laboratoriais de infecção por dengue. Outras doenças febris bacterianas e virais necessitam serem consideradas no diagnóstico diferencial. Conseqüentemente dados clínicos epidemiológicos e resultados de exames laboratoriais complementares e

testes específicos precisaram ser levados em conta para confirmar o diagnóstico. (PINHEIRO et al., 1998).

Modelos animais

Modelos experimentais são essenciais para estudar mecanismos patogênicos de infecções. A inoculação de camundongos, com vírus Oropouche, tem sido realizada para fins de isolamento, mas há poucos estudos experimentais de patogênese. Camundongos recém-nascidos, inoculados pela via intracebral, desenvolvem sinais de encefalite focal 24 a 48 horas após a inoculação (ARAÚJO et al., 1979). Um importante estudo experimental foi realizado por Araújo e colaboradores (ARAÚJO et al., 1978) que inocularam de hamster pela via intracerebral, demonstrando o viscerotropismo do vírus Oropouche.

O Hamster pertence ao Filo *Chordata*, classe *Mammalia*, Sub-Filo vertebrado, Ordem *Rodentia*, Família *Muridae* e Sub-Família: *Cricetinae*. O nome hamster vem da palavra hamstern, que em alemão, que significa "apropriar-se". Refere-se ao hábito de armazenar alimentos em duas bolsas internas, que tem na região final da boca e pescoço. É nessas bolsas que ele esconde também os filhotes quando pressente perigo. As espécies mais comuns criadas em cativeiro são: Hamster Sírio (*Mesocricetus Auratus*); Hamster Anão Russo Campbells (*Phodopus Sungoris Campbelli*); Hamster Anão Russo Branco Invernal (*Phodopus Sungoris Sungoris*); Hamster Chinês (*Cricetulus Griseus*); Hamster Roborovski (*Phodopus Roborovskii*).

Os hamsters são pequenos roedores e a maioria das espécies é estritamente noturna e habita regiões semi-desérticas, vivendo em galerias subterrâneas. Assim como os outros animais de sua Ordem, o hamster possui dentes de crescimento

contínuo, que precisam ser constantemente desgastados. Em geral, os roedores desgastam os dentes roendo alimentos. O sentido mais apurado do hamster é a audição, seguida pelo olfato. A visão é pouco desenvolvida.

O Hamster Sírio ou Hamster Dourado (gênero: *Mesocricetus* espécie: *Auratus*), é originário da Síria. Em 1930, um macho e três fêmeas foram capturados ao norte da Síria, nas proximidades de Aleppo, e inicialmente usados como cobaia em pesquisas científicas na Universidade Hebréia em Jerusalém. É provável, que destes hamsters, descendam todos os hamsters em cativeiro. O Hamster Sírio foi introduzido no mercado de animais de estimação, devido à docilidade e facilidade de criação, em 1945 na Inglaterra. Dentre todas as espécies, talvez este seja o mais conhecido no mundo inteiro. No Brasil, foi introduzido ilegalmente por volta de 1950, através da Argentina, escondido em caixas de charutos. Sua cor original é o dourado, de pêlo fino e textura macia e atualmente existem muitas cores diferentes, que vão do branco ao marrom escuro, com diferentes padrões e mutações de pelagens. Mede de 15 a 20 cm e chega a pesar 140g quando adulto. Possui hábitos vespertino-noturnos e seu período de gestação é em torno de 18 dias com média de 8 filhotes. Seu tempo de vida em cativeiro é de 2 a 2,5 anos, sua temperatura corporal varia de: 36,1 a 37,7°C e seus batimentos cardíacos oscilam de 280 a 500 batidas por minuto. Os hamsters possuem uma não merecida reputação de agressividade; naturalmente não são agressivos. Esta característica é exibida apenas quando são rudemente manipulados ou assustados. Entre os problemas mais frequentes relativos ao acasalamento estão: as brigas, canibalismo de jovens, fuga das caixas, grande suscetibilidade às alterações climáticas e à privação de alimentos ou água (CARVALHO, 2003; PESSOA, 2004).

Experimentos em hamsters jovens inoculados por via intracerebral com o vírus Oropouche demonstraram que ele possui propriedades hepato-visceotrópicas, com necrose isolada de hepatócitos ou necrose focal, e envolvimento de células de Kupffer, exibindo hiperplasia reativa. Os animais invariavelmente sucumbem à infecção (ARAÚJO et al., 1978). Tais achados não foram verificados no modelo em camundongo (DIAS apud ARAÚJO et al., 1978).

Conhecendo o relato prévio de Araújo e colaboradores (ARAÚJO et al., 1978), o presente trabalho foi realizado para melhor caracterizar o modelo de infecção de hamster pelo vírus Oropouche.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer e caracterizar um modelo experimental de infecção com vírus Oropouche em hamster, usando inoculação subcutânea; e dessa maneira contribuir para o entendimento da patogenia dessa infecção.

Propagação e preparo do estoque de vírus Oropouche

Vírus Oropouche da cepa de referência BeAn19991 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo) foi amplificado em cérebro de camundongo, através de 7 passagens seriadas. O procedimento consistiu na inoculação intracerebral de camundongos suíços recém-nascidos e sacrifício dos mesmos, assim que estes apresentaram sinais de encefalite, o que ocorreu em torno de 48 horas após a infecção. Em seguida foram congelados em freezer a -70°C, posteriormente descongelados, e seus cérebros removidos por punção a vácuo, obtendo-se de 80 a 100µL de extrato cerebral. Cada cérebro foi diluído em 900µL de meio MEM contendo 3% de soro bovino fetal. Na sequência, todo material extraído, foi centrifugado a 5445xg por 10 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi colhido, desprezando-se o sedimento de restos celulares formado, filtrado em poros de 0.22µm (Millipore.CO.USA), aliquotado e congelado em freezer a -70°C. Uma alíquota foi descongelada e titulada pelo método de TCID₅₀ em células Vero (REED & MUENCH, 1938), obtendo-se o título de 10^{7,25} TCID₅₀/mL.

Infecção dos hamsters

Os hamsters da espécie Síria (*Mesocricetus auratus*), também conhecidos como hamsters dourados, possuindo de 2 a 3 semanas de idade, foram obtidos junto ao Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto-SP. O inóculo foi retirado do freezer a -70°C e descongelado. O descongelamento foi feito sobre gelo, durante uma hora e meia, aproximadamente. Esse procedimento foi feito para evitar descongelamento brusco. Assim, os animais foram inoculados na coxa direita com injeção subcutânea contendo 10^{6,25} TCID₅₀/100µL, com agulha de uso intradérmico

(1ml c/ag. 13x 0,45 - Injex, Ourinhos, SP, Brasil). Animais controle foram inoculados com mesma quantidade de extrato de cérebro de camundongo recém-nascido sem vírus, da mesma ninhada de animais usados na passagem do estoque do vírus Oropouche.

Sacrifício dos animais

Antes do sacrifício, os animais foram monitorados diariamente, medindo-se seu peso e sua temperatura, com a utilização de um termômetro digital (Checktemp - Hanna instruments, USA). A princípio convencionou-se sacrificar os animais assim que estes manifestassem estado agônico por sinais graves da doença, como extrema letargia e paralisia. Depois, visando verificar a evolução da patogênese viral e quantificar o vírus Oropouche no sangue e em tecidos, adotou-se também o sacrifício de animais com ou sem sinais clínicos da doença, nos dias 1, 3, 5, 8 e 11 pós-infecção.

Os animais foram previamente anestesiados, por inalação de vapores de éter etílico (Synth, Labsynt, Diadema, SP, Brasil), e depois sacrificados através de exsanguinação por punção intracardíaca, utilizando seringa e agulha (5cc Syringe Luer Lok, c/ag. 25x 8 - Becton Dickinson & CO, USA). O sangue foi colhido para titulação viral, análise de bilirrubina e transaminases: TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica).

Análise do sangue

No caso do sangue colhido para titulação viral, a seringa foi previamente umedecida com heparina sódica, visando-se obter o plasma do sangue não

coagulado. Essa amostra, após um período de 30 minutos de descanso no gelo, foi centrifugada a 5445xg por 10 minutos, à temperatura ambiente, visando à sedimentação de células. Em seguida, o plasma foi armazenado em freezer a -70°C. Depois de colhidas e armazenadas, as amostras foram descongeladas e tituladas pelo método de TCID₅₀, em células de rim de macaco verde africano - Vero.

Amostras de soro foram também colhidas, sem adição de coagulante. Essas amostras permaneceram em repouso em temperatura ambiente, por 40 minutos em média, até completa coagulação e o soro foi colhido e armazenado em freezer a -70°C. Depois as amostras foram encaminhadas ao laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, para quantificação de bilirrubinas e transaminases.

Quantificação de vírus nos órgãos coletados

Amostras frescas do baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo da coxa direita, pulmão e rim foram colhidas, pesadas, colocadas em tubos, (contendo 1ml de meio MEM com 3% de soro bovino fetal) e armazenadas em freezer a -70°C.

Posteriormente essas amostras de tecido foram descongeladas lentamente sobre gelo, durante 1 hora e meio aproximadamente, e maceradas em tubos de 15ml (Corning Incorporated, NY 14831, USA), contendo 1ml de MEM com 3% de soro fetal bovino, utilizando pistilo de ponta aguda. Em seguida, esses macerados foram centrifugados a 5445xg por 10 minutos, à temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos, desprezando-se o produto celular sedimentado, e passados em filtro de 0.22µm (Millipore). Esses sobrenadantes filtrados foram, em seguida, titulados por efeito citopático em diluições seriadas decimais (TCID₅₀) em células Vero.

Imunofluorescência para confirmação da quantificação viral

As células foram coletadas das placas de 96 poços (utilizadas para titulação) após 72 horas, com auxílio de microponteiras. Primeiro foram removidos e desprezados 60µl do meio de cultivo dos poços escolhidos, que continham um total de 100µl. Depois, com o auxílio de ponteira, fez-se uma raspagem das células, que ainda estavam aderidas, e em seguida uma resuspensão destas com os 40µl restantes. Dez µl desta suspensão foram colocados em lâminas (Perfecta Ind. Ltda, Brasil), que continham espaços circulares (“spots”), e deixadas ao ar livre para secar. Após secarem as lâminas foram fixadas em acetona (Merck Darmstadt, Germany) por 15 minutos, secas ao ar livre novamente, e submetidas ao ensaio de imunofluorescência à seguir:

- 1) Aplicação do anticorpo primário anti-Oropouche (“M.I.A.F.” - Mouse immune ascitic fluids - gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo), na diluição de 1:100, diluído em PBS, pH 7,4 (Gibco). Após a aplicação do anticorpo primário as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 2) Lavagem por duas vezes, com PBS, pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez.
- 3) Bloqueio dos sítios inespecíficos, com solução de PBS, pH 7,4 (Gibco), contendo 10% de soro de cabra, em câmara úmida por 20 minutos à temperatura ambiente.
- 4) Lavagem por duas vezes, com PBS, pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez.

- 5) Aplicação do anticorpo (secundário) de cabra contra imunoglobulina de rato, marcado com isoticianato de fluoresceína (Gt x Ms IgG flúor - Chemicon, Inc.USA) na diluição 1:50, azul de Evans (Gibco), na diluição 1:20, diluídos em PBS, pH 7,4 (Gibco). Após a aplicação do conjugado as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 35 minutos à temperatura ambiente.
- 6) Lavagem por três vezes, com PBS, pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez. Depois, de lavadas, as lâminas foram secas e montadas com uma lâminula e glicerol composto de 90% de glicerina (Merck Darmstadt, Germany), e 10% de solução tampão composto de bicarbonato de sódio (Sigma Sigma Chemical CO, St. Louis.MO.USA) diluído em H₂O deionizada, com pH 9,5. (4,2g de NaHCO₃ em 100ml de H₂O deionizada).
- 7) A seguir as lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência.

Análise histológica

Amostras frescas do baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo da coxa direita, pulmão e rim foram colhidas e fixadas em uma solução de formalina tamponada, composta de 10% de formalina (Formaldehyde- 36,5-38%, Sigma Chemical CO, St. Louis.MO.USA), 10% de PBS 10 x, pH 7,4 (Gibco) e 80% de H₂O deionizada. Os órgãos foram removidos, imersos em um recipiente contendo 60ml da solução de formalina, e levados a uma câmara de vácuo (Lab Line Duo-Vac Oven; Lab Line Instruments, Inc. Melsrose Park, ILL, USA / Bomba de vácuo MA-058,

Marconi Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Essa câmara foi usada para gerar uma pressão negativa de 25 mmHg, e em seguida descomprimida. Esse procedimento foi realizado quatro vezes consecutivamente, visando melhor perfusão e penetração do fixador nos órgãos, com objetivo de melhorar a fixação. Logo após, os órgãos foram colocados em um recipiente de vidro, contendo 10ml de solução fixadora nova e mantidos em geladeira por 20 horas aproximadamente. Depois de fixados, os órgãos foram desidratados, diafanizados e inclusos em parafina, conforme o protocolo a seguir:

Desidratação.

- 1) Imersão em etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha), contendo 20% de H₂O deionizada por 2 horas.
- 2) Transferência para etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha), contendo 10% de H₂O deionizada por 2 horas.
- 3) Etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha), contendo 5% de H₂O deionizada por 2 horas.
- 4) Etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha), por 20 horas aproximadamente (“overnight”).
- 5) Repetir 2 vezes em etanol absoluto fresco por 30 minutos.

Diafanização.

- 1) Imersão em 50% etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha) e 50% de xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México), por 20 minutos.

2) Transferência para uma solução contendo 100% de xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México), por 30 minutos.

3) Repetir mais duas vezes com troca de xilol.

Inclusão da parafina.

1) Transferência para um recipiente contendo parafina (Paraplast Plus Tissue Embedding Médium, Oxford Labware, St. Louis.MO, USA) em fase líquida, mantida em estufa a 60°C, por 2 horas.

2) Repetir com uma troca de parafina fresca por mais 2 horas.

3) Após a embebição os órgãos foram inclusos em outra parafina fresca (Paraplast Plus Tissue Embedding Médium, Oxford Labware, St. Louis.MO, USA).

Os órgãos parafinados foram cortados em micrótomo (Leika S.A. Germany), na espessura de 4 a 5 μ m, e colocados em lâminas de vidro comuns para H.E. e em lâminas silanizadas para imunohistoquímica.

Método de coloração por hematoxilina e eosina (H.E.)

Antes da reação com a solução de hematoxilina e eosina (H.E.) as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas seguindo os seguintes passos:

1) Incubação em estufa a 60°C, por 30 minutos, para escorrer a parafina dos cortes.

2) Imersão em xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México) por 5 minutos, seguida de 1 troca por xilol por mais de 5 minutos.

3) Hidratação em bateria de soluções de etanol em concentrações decrescentes (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha). Primeiro as lâminas foram imersas em etanol absoluto 100%, permanecendo por 3 minutos; a seguir etanol contendo 5% de H₂O destilada por 3 minutos; depois etanol contendo 10% de H₂O destilada por 3 minutos; depois etanol contendo 20% de H₂O destilada por 3 minutos; depois etanol contendo 30% de H₂O destilada por 3 minutos e finalmente em etanol contendo 50% de H₂O destilada por 3 minutos. Depois as lâminas foram incubadas em H₂O corrente por 3 minutos, seguida de 2 trocas por H₂O destilada sem intervalos de tempo.

Após hidratação, as lâminas foram submetidas ao protocolo de coramento com a solução de hematoxilina e eosina (H.E.) a seguir.

- 1) Incubação em solução de Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
- 2) Lavagem em H₂O corrente por 3 minutos, seguida de 2 trocas por H₂O destilada sem intervalos de tempo.
- 3) Incubação em solução de eosina floxina por 1 minuto.
- 4) Incubação em solução de etanol acetificado contendo 5% de H₂O destilada por 1 minuto, seguida de uma troca do etanol acetificado contendo 5% de H₂O destilada, por mais 1 minuto.
- 5) Incubação em solução de etanol absoluto 100% (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha) por 1 minuto, seguida de uma troca do etanol absoluto 100%, por mais 1 minuto.

Após coloração com a solução de hematoxilina e eosina (H.E.), as lâminas foram submetidas ao protocolo de diafanização a seguir:

- 1) Imersão em 50% etanol absoluto (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha) e 50% de xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México), por 5 minutos.
- 2) Transferência para uma solução contendo 100% de xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México), por 5 minutos.
- 3) Repetir mais duas vezes com troca de xilol.

Depois de retiradas e secas as lâminas foram montadas com uma lamínula e Permout (Fisher Scientific fairlawn, New Jersey 07410, USA).

Preparo da Hematoxilina Harris:

- 1) Preparar a solução 1: dissolver 2g de hematoxilina (Merck Darmstadt, Germany) em 20 ml de etanol absoluto e deixar repousar por 24 horas.
- 2) Preparar a solução 2: dissolver 20g de alumem de potássio sulfato em 400ml de H₂O destilada e deixar repousar por 24 horas.
- 3) Juntar as soluções 1 e 2 e adicionar 1g de hidrogirum oxidatum rubrum cryst (óxido de mercúrio vermelho).
- 4) Colocar toda a mistura para ferver, quando atingir o ponto de ebulição deixar por 5 minutos e retirar.
- 5) Após a retirada esfriar rapidamente e filtrar. Depois de filtrado armazenar em local ao abrigo da luz ou recipiente escuro.

Preparo da eosina-floxina (solução alcoólica):

- 1) Preparar uma solução de eosina (Merck Darmstadt, Germany) a 1% em H₂O destilada.
- 2) Preparar uma solução de floxina (Merck Darmstadt, Germany) a 1% em H₂O destilada.

3) Juntar 50ml da solução de eosina (11,2%), mais 5 ml da solução de floxina (1,1%), mais 390ml de etanol 95Gl (87,2%) e 2ml de ácido acético glacial (Synth, Labsynt, Diadema, SP, Brasil) (0,4%).

Imunohistoquímica

Antes da reação de imunohistoquímica as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas seguindo os seguintes passos:

- 1) Incubação em estufa a 60°C, por 30 minutos, para escorrer a parafina dos cortes.
- 2) Imersão em xilol (Mallinckrodt Baker, S.A., Cidade do México, México) por 30 minutos, seguida de 2 trocas por xilol fresco a intervalos de 10 minutos.
- 3) Hidratação em bateria de soluções de etanol em concentrações decrescentes (Panreac Química S.A., Barcelona, Espanha). Primeiro as lâminas foram imersas em etanol absoluto 100%, permanecendo por 5 minutos; a seguir etanol contendo 10% de H₂O deionizada por 5 minutos; depois etanol contendo 20% de H₂O deionizada por 5 minutos e finalmente em etanol contendo 30% de H₂O deionizada por 5 minutos. Depois as lâminas foram incubadas em H₂O deionizada por 10 a 15 minutos.

Após hidratação, as lâminas foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica a seguir.

- 1) Incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 4% (em H₂O deionizada), por 30 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena.

- 2) Lavagem em PBS pH 7,4 (Gibco), com agitação, por 5 minutos.
- 3) Bloqueio dos sítios inespecíficos, com solução de PBS, pH 7,4 (Gibco), contendo 10% de soro de cabra, mais 10% de soro de cavalo (Vectastain - ABC Kit - Vector Laboratories, Inc.CA.USA), em câmara úmida por 20 minutos à temperatura ambiente.
- 4) Após remoção do excesso foi aplicado o anticorpo primário anti-Oropouche (“M.I.A.F.” - Mouse immune ascitic fluids - gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo), na diluição de 1:100, usando como diluente a solução composta de: 1 ml de leite em pó molico (Nestlé S.A.) á 5% (solução aquosa), 0,5 ml de PBS 10x , pH 7,4 (Gibco), 3,5 ml de H₂O deionizada autoclavada, 75µl de soro de cavalo. (Vectastain - ABC Kit - Vector Laboratories, Inc.CA.USA) (concentração final:1,5%) e 75µl de soro de cabra (concentração final: 1,5%).
Após a aplicação do anticorpo primário as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 5) Lavagem por duas vezes, com PBS, pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez.
- 6) Incubação com anticorpo de cavalo anti-imunoglobulina de camundongo, marcado com biotina (Vectastain - ABC Kit - Vector Laboratories, Inc.CA.USA), na diluição 1:2000, no diluente do anticorpo primário, em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 7) Lavagem por duas vezes com PBS pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez.

- 8) Aplicação do complexo avidina-biotina (Vectastain - ABC Kit - Vector Laboratories, Inc.CA.USA), na diluição 1:50, de acordo com instruções do fabricante, com incubação em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente.
- 9) Lavagem por duas vezes com PBS pH 7,4 (Gibco), sob agitação por 5 minutos cada vez.
- 10) Aplicação do substrato DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride - DAB Substrate Kit for Peroxidase - Vector Laboratories, Inc.CA.USA), na diluição 1:25 em água destilada, de acordo com as instruções do fabricante, seguido de incubação em câmara úmida, ao abrigo da luz, por 10 minutos.
- 11) Lavagem por duas vezes com água destilada, sob agitação por 5 minutos cada vez.
- 12) Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos seguida de lavagem em água corrente por 3 minutos. Depois de retiradas da água e secas, as lâminas foram montadas com uma lâminula e Entellan (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany).

Manifestações clínicas dos hamsters infectados com o vírus Oropouche

Em torno do terceiro dia, após a infecção, os animais começaram a apresentar sinais da doença. Metade deles manifestou sinais brandos: eriçamento dos pêlos e agressividade, sendo mais evidente em alguns do que em outros. Os outros 50% apresentaram, além dos sinais brandos, sinais mais graves: melindre, letargia, tremor parecido com calafrio, perda de peso e paralisia, sendo que este quadro também variou entre os animais.

Entretanto, do total de animais pesquisado, alguns apresentaram sinais clínicos somente após o oitavo, nono, e décimo dias de infecção. A perda de peso, por parte dos animais com sinais graves também variou. Alguns começaram a perder peso após o quarto dia da infecção e outros somente após o oitavo dia. A figura 3 mostra a perda de peso de alguns desses animais com sinais graves, ressaltando que o final de cada linha do gráfico representa o dia do sacrifício.

Cerca de 45% dos animais inoculados apresentaram elevação térmica, no entanto apenas 50% dos animais que apresentaram essa elevação de temperatura manifestaram sinais graves da doença concomitante com a elevação de temperatura. A figura 4 mostra a evolução da temperatura de oito animais inoculados.

Figura 4 - De acordo com a literatura (Carvalho, 2004; Pessoa, 2004) a temperatura média normal do hamster varia de 36,1°C a 37,7°C. No presente estudo considerou-se como estado febril temperaturas acima de 37,7°C.

Ainda, 17% de todos animais infectados apresentaram hipotermia, associada a um quadro agônico. A letalidade verificada em um grupo de 10 hamsters inoculados foi de 30%. Caso sejam contados todos os animais inoculados ao longo de todo o estudo e considerados os animais sacrificados em estado agônico como mortos, a letalidade chega a 48,8%.

Não foi possível determinar com exatidão a dose letal 50 (LD₅₀) de vírus Oropouche em hamsters inoculados pela via subcutânea. O inóculo puro, com título de $10^{8,25}$ TCID₅₀/ml, causou morte em 5 de um lote de 9 animais e a diluição decimal seguinte, contendo $10^{7,25}$ TCID₅₀/ml causou morte em somente 3 de 10 animais inoculados. Não foi possível aplicar a equação de Reed and Muench a esses dados, mas considerando que o inóculo usado foi de 100 µl, é possível inferir que a LD₅₀ deve estar entre $10^{7,25}$ e $10^{6,25}$ TCID₅₀. (dados não mostrados).

Títulos de vírus nos órgãos

A quantidade de vírus Oropouche foi significativa no cérebro, fígado e no plasma, sendo que no baço, coração, pulmão, rim e tecido muscular esquelético, não foram expressivos. Os resultados dos títulos do vírus no cérebro, fígado e plasma estão apresentados a seguir na figura 5.

Figura 5 - Títulos do vírus Oropouche em: cérebro, fígado e plasma

O controle utilizado foi órgão de hamster não infectado. Esses órgãos foram titulados, mas apresentaram efeito citotóxico sobre as células Vero. Então para confirmar o resultado acima foram realizados ensaios de imunofluorescência. A figura 6 mostra um exemplo de uma imunofluorescência confirmatória de células Vero utilizadas na titulação de um cérebro de hamster infectado (sacrificado com 7 dias) e as figuras 7 e 8 são de um cérebro de hamster não infectado, sacrificado com 7 dias também.

**Figura 6 - ORO positivo
(campo escuro)**

**Figura 7 – Controle
negativo
(campo claro)**

**Figura 8 – Controle
negativo
(campo escuro)**

Achados Histopatológicos

Foram realizados cortes histológicos de: baço, cérebro, coração e fígado. Dentre esses, os que apresentaram sinais de inflamação foram o cérebro e o fígado. A histologia do cérebro evidenciou encefalite com infiltrado inflamatório consistindo de células mononucleares, mas também contendo células polimorfonucleares, localizado em torno dos vasos na forma distinta manguito perivascular (figura 10), e como também difusamente no tecido cerebral (Figura 11). Além disso, havia meningite significativa consistindo predominantemente de células mononucleares, mas também contendo polimorfonucleares (Figura 12).

Figura 9 – Histologia do cérebro de hamster não infectado.
(Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 10 – Meningoencefalite após 7 dias de inoculação subcutânea, com
manguito perivascular e meningite. (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 11 – Foco de encefalite após 7 dias de inoculação subcutânea. (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 12 – Cérebro de hamster após 7 dias de inoculação subcutânea. (Aumento: 100x; barra: 20 μ m)

A histologia do fígado revelou inflamação abundante, localizada predominantemente entre o sistema porta e a veia centrolobular, com a presença de células mononucleares, histiócitos, e eosinófilos espalhados. Foi observada uma inflamação moderada terminando nas veias centrolobulares. Houve ainda, necrose focal, congestão sinusoidal, e uma considerável hiperplasia das células de Kupffer. (figura 14).

Figura 13 – Histologia do fígado de hamster não infectado. (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 14 – Lesão hepática após 7 dias de inoculação subcutânea. (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Detecco por imunohistoqumica do vrus Oropouche

Antgeno do vrus Oropouche foi detectado em neurnios em vrias regies do crebro, e difusamente distribuído no fgado em associao com hepatcitos. Os animais apresentaram antgeno marcado partir do quarto dia de infeco.

As figuras 15 e 16 apresentam cortes sagitais de crebro de hamster no infectados.

Figura 15 - Crebro no infectado - Controle - 5dias (Aumento: 100x ; barra: 20m)

Figura 16 - Crebro no infectado - Controle - 5dias
(Aumento: 200x ; barra: 10m)

As figuras 17 e 18 apresentam cortes sagitais de cérebro após 4 dias de infecção, com antígeno ORO marcado.

Figura 17 - Cérebro infectado com ORO – 4 dias
(Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 18 - Cérebro infectado com ORO – 4 dias
(Aumento: 400x ; barra: 5 μ m)

As figuras 19, 20 e 21 apresentam cortes sagitais de cérebro após 5 dias de infecção, com antígeno ORO marcado.

Figura 19 - Cérebro infectado com ORO – 5 dias (Aumento: 100x ; barra: 20 μ m)

Figura 20 - Cérebro infectado com ORO – 5 dias (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 21 - Cérebro infectado com ORO – 5 dias
(Aumento: 400x ; barra: 5 μ m)

As figuras 22 e 23 apresentam cortes coronais de cérebro após 11 dias de infecção, com antígeno ORO marcado.

Figura 22 - Cérebro infectado com ORO –
11 dias (Aumento: 100x ; barra: 20 μ m)

Figura 23 - Cérebro infectado com ORO -
11 dias (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

As figuras 24 e 25 apresentam cortes coronais de cérebro após 13 dias de infecção.

Figura 24 - Cérebro infectado com ORO - 13 dias (Aumento: 200x ; barra: 10 μ m)

Figura 25 - Cérebro infectado com ORO - 13 dias (Aumento: 400x; barra: 5 μ m)

Nas figuras à seguir, o antígeno ORO foi detectado difusamente distribuído no fígado em associação com hepatócitos. As figuras 26 e 27 apresentam respectivamente corte de fígado de hamster não infectado e infectado, após 8 dias de infecção.

Figura 26 - Fígado não infectado - Controle- 8 dias (Aumento: 100x ; barra: 20 μ m)

Figura 27 - Fígado infectado com ORO - 8 dias (Aumento: 100x ; barra: 20 μ m)

Não foi encontrada marcação significativa no coração ou em outros órgãos examinados.

Pouco se sabe a respeito da patogênese do vírus Oropouche. Não são conhecidas fatalidades causadas por esse agente e, portanto, não há dados de autópsia disponíveis sobre lesões causadas em tecidos humanos (PINHEIRO et al., 1998). Os únicos achados relatados são alterações ultraestruturais - necrose de hepatócitos - em fígado de hamster, inoculado por via intracerebral (ARAÚJO et al., 1978). O presente estudo, realizado em hamsters inoculados por via subcutânea, tentando simular a infecção natural, demonstrou que o vírus Oropouche causa viremia e que possui marcante tropismo por fígado e por cérebro.

Modelos experimentais de infecções virais em hamster já foram descritos para outros vírus da família *Bunyaviridae*: os vírus Andes (ANDV) (HOOPER et al., 2001) e Maporal (MAP) (MILAZZO et al., 2002), do gênero *Hantavirus*, os vírus Gabek Forest e Punta Toro (FISHER et al., 2003), do gênero *Phlebovirus*; e também para vírus de outras famílias, tais como os vírus da Febre Amarela (TESH et al., 2001; XIAO et al., 2001a) e do Oeste do Nilo (XIAO et al., 2001b), da família *Flaviviridae*; e o vírus emergente Nipah, da família *Paramyxoviridae* (WONG et al., 2003).

Em seres humanos a infecção por vírus Oropouche é caracterizada por uma doença febril aguda, cujo período de incubação varia de 4 a 8 dias, ao fim dos quais os pacientes apresentam, em geral de forma brusca, febre, calafrios, tonturas, cefaléia, dores musculares, artralgia e fotofobia (PINHEIRO et al., 1976; PINHEIRO et al., 1981b; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1996). Em hamsters o período de incubação foi comparável, variando de 3 a 9 dias.

Todos os hamsters inoculados com vírus Oropouche manifestaram algum sinal clínico. Estes sinais foram brandos ou sutis em cerca de 50% dos animais e

mais severos no restante. Cerca de 45% dos hamsters inoculados manifestaram elevação térmica e somente àqueles que apresentaram sinais clínicos mais graves, tais como tremores e paralisia, tiveram perda de peso.

Em hamsters que desenvolveram sinais mais graves de doença, foi possível notar tremores possivelmente calafrios, mas não foi possível afirmar que teriam sido causados por variações na temperatura do animal, pois nem todos os animais com tremores apresentaram hipertermia ou hipotermia. Outros sinais encontrados em seres humanos, tais como tontura, cefaléia, dores musculares, artralgia e fotofobia, não são passíveis de avaliação no animal experimental.

Os animais inoculados mostraram heterogeneidade marcante nas manifestações da infecção experimental. Tal variação provavelmente se deve a diferenças de susceptibilidade entre animais de uma espécie cujo *background* genético é variável.

A escolha do hamster, um animal não isogênico, para modelo experimental, baseou-se na existência de descrições preliminares de patologia hepática induzida por vírus Oropouche nessa espécie. Apóia-nos o fato de que animais selvagens de diferentes espécies são possíveis hospedeiros (definitivos ou intermediários) do vírus Oropouche na natureza (PINHEIRO et al., 1981b), o que indica alta adaptabilidade desse agente. Alguns macacos e aves selvagens, bem como galinhas sentinela expostas em floresta em Altamira-PA e raros marsupiais e morcegos, foram encontrados seropositivos para vírus Oropouche. Infecção não foi encontrada em répteis, carnívoros e ungulados selvagens testados (PINHEIRO et al., 1981b).

Inúmeros achados apontam as preguiças e os macacos como sendo os principais hospedeiros vertebrados do vírus Oropouche, embora existam evidências

de que certas espécies de aves silvestres também desempenhem esta função (PINHEIRO et al., 1976; PINHEIRO et al., 1981b).

Após a infecção dos hamsters pelo vírus Oropouche foi verificado, através da titulação de vírus no plasma, que a viremia começa já no primeiro dia ($10^{1.8}$ TCID₅₀/ml), se eleva rapidamente no terceiro dia alcançando seu pico (10^6 TCID₅₀/ml). No sétimo, dia o título ainda é expressivo ($10^{4.7}$ TCID₅₀/ml) e, no oitavo, o título é de $10^{2.7}$ TCID₅₀/ml. Uma infecção sistêmica, com uma fase virêmica, também é verificada em seres humanos, com praticamente todos os pacientes mostrando-se virêmicos nos dois primeiros dias de enfermidade. A proporção de pacientes com viremia cai para 72% no 3º dia da doença e para 44% e 23% no 4º e 5º dias, respectivamente (TRAVASSOS DA ROSA, 1998).

Ficou evidente que após a inoculação subcutânea do vírus Oropouche, ocorre uma infecção disseminada, o que se comprova nos achados cerebrais e hepáticos. Nos cortes de cérebro, corados com H.E., verificou-se um aumento de células polimorfonucleares na região da meninge, compatível com meningite.

Muitos arbovírus são capazes de causar alterações neurológicas em seres humanos. Dentre eles, os mais importantes são os vírus da encefalite de São Luís (SLE), da encefalite Japonesa (JE), da encefalite do vale do Murray, das encefalites eqüinas leste (EEE), oeste (EEO) e venezuelana (VEE), da encefalite verno-estival da Rússia (RSSE), e das encefalites pelos vírus La crosse, Powassan e Rocio (PINHEIRO et al., 1997). No presente estudo, através da técnica de imunohistoquímica, foram achados vários neurônios infectados com o vírus Oropouche. Os títulos de vírus Oropouche no cérebro ao longo da infecção, mostram que houve acúmulo progressivo de vírus nesse órgão, que se iniciou precocemente

após a inoculação e se elevou em cerca de duas ordens decimais de magnitude entre o terceiro e o oitavo dias, chegando até $10^{7,23}$ TCID₅₀/grama de tecido em um dos animais infectados.

Assim, este estudo evidenciou o tropismo do vírus Oropouche por tecido nervoso, especialmente por neurônio. Não é possível, com base nos resultados obtidos, avaliar os mecanismos desse marcante neurotropismo, visto que não se conhecem determinantes da distribuição tissular de Oropouche, tais como natureza do receptor e permissividade diferencial de diferentes órgãos. Todavia, é possível especular que o vírus pode apresentar este comportamento como uma estratégia de evasão do sistema imune do hospedeiro, replicando-se em células que garantem menor exposição à vigilância do sistema imune. Tal comportamento é visto em vários vírus, tais como o vírus herpes, o vírus da raiva e outros.

Apesar de o vírus Oropouche estar presente no tecido nervoso de hamster, não é possível afirmar que semelhante comportamento ocorra em seres humanos, pois afinal não há descrições histológicas publicadas de tecido nervoso humano infectado por este agente. A julgar pelas características clínicas da febre do vírus Oropouche, que são mais compatíveis com infecção aguda febril inespecífica, é pouco provável que haja proeminente acometimento cerebral. Todavia, a ocorrência de meningite causada por vírus Oropouche, embora não seja freqüente, foi documentada (PINHEIRO et al., 1982a). Isso evidencia capacidade de penetração do vírus no sistema nervoso central. É importante lembrar que não pode ser descartada a hipótese de que haja manifestações leves ou pouco freqüentes de encefalite, que tenham passado despercebidas nos trabalhos descritivos de surtos epidêmicos de Oropouche com vastas quantidades de pacientes acometidos.

Não há relatos de encefalite ou de infecção em tecido cerebral causada por outro vírus da família *Bunyaviridae* em hamster. Existem relatos de acometimento cerebral pelos vírus do Oeste do Nilo (XIAO et al., 2001b), que pertence à família *Flaviviridae* e do vírus Nipah, da família *Paramyxoviridae* (WONG et al., 2003).

No presente estudo, utilizamos como inóculo de vírus Oropouche passado de 7 a 9 vezes em cérebro de camundongos recém-nascidos (1 a 3 dias). Isso teoricamente pode ter gerado um vírus adaptado, com tropismo preferencial pelo sistema nervoso central mesmo em hospedeiro de outra espécie. Apesar do número baixo de passagens em cérebro de camundongo, é possível que tenhamos selecionado um fenótipo relativamente mais neuroinvasivo, o que explicaria os achados no cérebro.

Todavia, cumpre frisar que em seres humanos o vírus Oropouche é capaz de causar meningite asséptica e que o mesmo já foi isolado do fluido cérebro-espinhal em um caso de meningite (PINHEIRO et al., 1982a). Isso sugere que o vírus tem a habilidade de cruzar a barreira hematocefálica.

No fígado, cortes histológicos corados em H.E. mostraram inflamação abundante com presença de células mononucleares, histiócitos e eosinófilos, com necrose focal, congestão sinusoidal, e uma considerável hiperplasia das células de Kupffer. Já haviam sido relatadas alterações ultraestruturais em fígados de hamsters, 6 horas após a inoculação intracerebral do vírus, com necrose isolada de hepatócitos ou necrose focal, com participação das células de Kupffer do tipo hiperplasia reacional, sendo que partículas virais não foram encontradas por microscopia eletrônica (ARAÚJO et al., 1978). Os resultados do presente estudo, utilizando outra via de inoculação, mais próxima da via natural de infecção, corroboram o estudo

anterior (ARAÚJO et al., 1978), e mostram que, independente da via de inoculação ser cerebral ou subcutânea, o vírus Oropouche causa infecção disseminada com hepatite severa em hamster.

Títulos de Oropouche no fígado mostram que o vírus estava presente naquele órgão durante todo o período de observação, desde o primeiro dia pós-infecção, com um pico de cerca de duas ordens decimais de magnitude no terceiro dia, chegando em um dos animais a alcançar $10^{6,67}$ TCID₅₀/grama. Além do dado virológico quantitativo, a abundância de antígenos de Oropouche detectados por imunohistoquímica no fígado, indica a presença de uma grande quantidade de vírus nesse órgão.

A comparação das curvas de títulos em cérebro e fígado indica diferença na cinética de acúmulo de partículas nesses dois órgãos. Tais diferenças talvez sejam devidas a dificuldades para atravessar a barreira hematocefálica. É possível que somente após acúmulo precoce de vírus em outros órgãos - como o fígado - Oropouche consiga atravessar essa barreira. Uma possibilidade alternativa é que, a exemplo de outros vírus como pólio (PALLANSCH & ROSS, 2001) e raiva (MATTOS et al., 2001), o vírus Oropouche atinja o sistema nervoso central através de neurônios.

Embora não seja possível estabelecer correlação imediata com a infecção humana, pois não há relatos de biópsia hepática em humanos com infecção por Oropouche, os achados no fígado mostram hepatite com intensa replicação viral. Nesse sentido, há descrições de elevação moderada das transaminases em casos de infecção humana (PINHEIRO et al., 1981b).

Outros vírus da família *Bunyaviridae* também apresentaram tropismo pelo fígado em hamsters, como os vírus Andes (ANDV) (HOOPER et al., 2001) do gênero *Hantavirus* e os vírus Gabek Forest e Punta Toro (FISHER et al., 2003), do gênero *Phlebovirus*. Também o *phlebovirus* Rift Valley fever virus (RVFV) causa necrose focal hepática em cordeiros, cabritos e bezerros, produzindo uma doença fulminante e fatal (GEAR, 1988). Em hamster o RVFV causa doença semelhante àquela observada em carneiros e cabras jovens (FISHER et al., 2003). Os hamsters infectados apresentaram um aumento dos níveis de transaminases glutâmico-oxalacético (TGO) e glutâmico-pirúvico (TGP) após o quinto dia de infecção, perdurando até o oitavo dia e voltando aos níveis normais no 11º dia após infecção. Os níveis de bilirrubina não apresentaram alterações.

Um dos principais interesses em virologia é encontrar sistemas ou modelos experimentais que se aproximem o suficiente da biologia humana. Modelos experimentais mais aproximados podem ser desenvolvidos em primatas não-humanos, mas devido aos altos custos de criação, reprodução e manutenção, e às leis de proteção aos animais, fica praticamente inviável sua utilização. Neste contexto, o modelo em hamster seria uma opção para se estudar a biologia e patogênese do vírus Oropouche e para avaliar e testar drogas e vacinas.

- O vírus Oropouche induz uma infecção sistêmica em hamsters por inoculação subcutânea. O modelo experimental é relevante para estudos sobre a patogênese do vírus Oropouche.
- Altos títulos de vírus Oropouche são obtidos no cérebro e no fígado dos animais com infecção clínica.
- Respectivamente, encefalite e hepatite severas, são componentes patológicos importantes da infecção.
- Imunohistoquímica para vírus Oropouche demonstrou marcação de inúmeras células no cérebro, incluindo abundantes neurônios infectados. Esta é a primeira evidência documentada de infecção de vírus Oropouche em neurônios.
- Imunohistoquímica para vírus Oropouche no fígado também demonstrou abundantes hepatócitos infectados.
- Não foi encontrada presença significativa de antígeno do vírus Oropouche no coração, ou em outros órgãos examinados, por imunohistoquímica.
- Estudos moleculares desses órgãos poderão fornecer novos discernimentos sobre a patogênese desta importante infecção.

- ANDERSON, C. R.; SPENCE, I.; DOWNS, W. G.; AITKEN, T. H. G. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.10, p.574-578, 1961.
- ARAÚJO, R.; DIAS, L. B.; ARAÚJO, M. T. F.; PINHEIRO, F.; OLIVA, F. P. Alterações ultra-estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (tipo BEAN 19991). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.20, p.45-54, 1978.
- ARAÚJO, R.; PINHEIRO, F. P.; ARAÚJO, M. T.; DIAS, L.B. Patogenia das lesões hepáticas na infecção experimental com o vírus Oropouche (BeAn 19991): análise comparativa das curvas virêmica e de infectividade com as alterações ultra-estruturais. **Hiléia Méd. Belém**, v.1, p.7-12, 1979.
- BOULOY, M.; VIALAT, M.; GIRARD, M.; PARDIGNON, N. A transcript from the S segment of the Germiston bunyavirus is uncapped and codes for nucleoprotein and a non structural protein. **J. Virol.**, v.9, p.717-723, 1984.
- BORBOREMA, C. A. T.; PINHEIRO, F. P.; ALBUQUERQUE, B. C.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; DOURADO, H. V. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche no Estado do Amazonas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.24, p.132-139, 1982.
- CARVALHO, J. C. T. **Tudo sobre hamster**. 2003. Disponível em: <<http://www.hamster.com.br>>. Acesso em: 23 jun. 2004.
- CASH, P.; VEZZA, A. C.; GENTSH, J. R.; BISHOP, D. Genome complexities of three mRNA species of snowshoe hare bunyavirus and *in vitro* translation of S mRNA to viral N polypeptide. **J. Virol.**, v.31, p.685-689, 1979.
- CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILLIPS, I. Fiebre de Oropouche en Iquitos: Reporte preliminar de 5 casos. **Rev. Farmacol. Terap.**, v.2, p.12-14, 1992.
- DIXON, K. E.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; LLEWELLYN, C. H. Oropouche virus II. Epidemiological observations during an epidemic in Santarém, Pará, Brazil in 1975. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.161-164, 1981.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Jatobal virus antigenic characterization by Elisa and neutralization test using eia indicator, on tissue culture. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.83, n.2, p.161-164, 1988.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FIORRILO, M. A. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Rev. Saúde Públi.**, v.20, n.3, p.204-211, 1986.

- FISHER, A. F.; TESH, R. B.; TONRY, J.; GUZMAN, H.; LIU, D.; XIAO, S. Y. Induction of severe disease in hamsters by two sandfly fever group viruses, Punta Toro and Gabek Forest (*Phlebovirus*, *Bunyaviridae*), similar to that caused by Rift Valley Fever virus. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.69, n.3, p.269-276, 2003.
- FREITAS, R. B., PINHEIRO, F. P., SANTOS, M. A. V.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; FREITAS, E. N. Epidemia de vírus Oropouche no leste do Estado do Pará, 1979. In: PINHEIRO, F. P. **International Symposium on Tropical Arboviroses and Hemorrhagic Fevers**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1982. p.59-71.
- GAVRILOVSKAYA, I. N.; BROWN, E. J.; GINSBERG, M. H.; MACKOW, E. R. Cellular entry of Hantavirus which hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by β_3 -integrins. **J. Virol.**, v.73, n.5, p.3951-3959, 1999.
- GAVRILOVSKAYA, I. N.; SHEPLEY, M.; SHAWN, R.; GINSBERG, M. H.; MACKOW, E. R. β_3 -integrins mediated the cellular entry of hantavirus that cause respiratory failure. **Proc. Natl. Acad. USA.**, v.9, n.95, p.7074-7079, 1998.
- GEAR, J. H. S. Rift valley fever. In: _____ **Handbook of viral and rickettsial hemorrhagic fevers**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p.101-118.
- GIBBONS, A. Where are “new” diseases born? **Science**, v.261, p.680-681, 1993.
- GUBLER, D. J. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, n.3, p.442-450, 1998.
- HOCH, A. L.; ROBERTS, D. R.; PINHEIRO, F. D. P. Breeding sites of *Culicoides paraensis*, and other options for control by environmental management. **Bull. Pan Am. Health Org.**, v.20, p.284-293, 1986.
- HOOVER, J. W.; LARSEN, T.; CUSTER, D. M.; SCHMALJOHN, C. S. A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. **Virology**, v.289, n.1, p.6-14, 2001.
- THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES **Universal System of Virus Taxonomy**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV>>. Acesso em: 23 jun. 2004.
- KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses**. 3.ed. San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1985.
- KINNEY, R. M.; CALISHER, C. H. Antigenic relationships among Simbu serogroup (*Bunyaviridae*) viruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.1307-1318, 1981.

- LEDUC, J. W.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.A. Epidemic Oropouche virus disease in northern Brazil. **Bull. Pan Am. Health Organ.**, v.15, p.97-103, 1981.
- LEDUC, J. W.; PINHEIRO, F. P. Oropouche fever. In: MONATH, T. P. (Ed.) **The arboviruses: epidemiology and ecology**. Boca Raton: CRC Press, 1986. v.4, p.1-14.
- LINLEY, J. R.; HOCH, A. L.; PINHEIRO, F. P. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. **J. Med. Entomol.**, v.20, p.347-364, 1983.
- LUDWIG, G. V.; ISRAEL, B. A.; CHRISTENSEN, B. M.; YUILL, T. M.; SCHULTZ K. T. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. **Virology**, v.181, p.564-571, 1991.
- MATTOS, C. A.; MATTOS, C. C.; RUPPRECHT, E. Rhabdoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Williams, 2001. p. 1245-1277.
- MILAZZO, M. L.; EYZAGUIRRE, E. J.; MOLINA, C. P.; FULHORST, C. F. Maporal viral infection in the Syrian golden hamster: a model of hantavirus pulmonary syndrome. **J. Infect. Dis.**, v.186, n.10, p.1390-1395, 2002.
- MORELI, M.L.; AQUINO, V. H.; CRUZ, A.C.R.; FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of Oropouche Virus Infection by RT-Nested-PCR. **J. Med. Virol.** v.66, p. 139-142, 2002.
- MURPHY, F. A. Emerging zoonosis. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p.429-435, 1998.
- NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Williams, 2001. p. 1603-1633.
- NUNES, M. R. T.; CHAVES, I. T. M. M.; RODRIGUES, S. G.; CRUZ, A. C. R.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. SHOPE, R. E. TESH, R. B.; VASCONCELOS, P. F. C. Nucleotide sequence determination of the SRNA segment of oropouche virus strain isolated from a monkey in Minas Gerias state. **Virus Reviews & Research**, v.7, p.91, 2002. Suplemento 1. (Apresentado no XIII NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 2002, Águas de Lindóia-SP).
- PALLANSCH, M. A.; ROSS, R. P. Enteroviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott-Williams, 2001. p. 723-775..
- PESSOA, C. A. **Hamsters: saiba mais sobre eles**. 2004. Disponível em: <<http://www.saudeanimal.com.br/hamster.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2004.
- PINHEIRO, F. P. Febre do Oropouche. **J. Bras. Méd.**, v.44, p.46-62, 1983.

- PINHEIRO, F. P.; HOCH, A. L.; GOMES, M. L. C.; ROBERTS, D. R. Oropouche virus IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.172-176, 1981b.
- PINHEIRO, F. P.; PINHEIRO, M.; BENSABATH, G.. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. **Rev. Ser. Esp. Saúde Publ.**, v.12, p.15-23, 1962.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; FREITAS, R. B. Arbovírus. Aspectos clínico-epidemiológicos. In: _____ **Instituto Evandro Chagas: 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém: Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p.349-357.
- PINHEIRO, F. P.; ROCHA, A.G.; FREITAS, R. B.; OHANA B. A.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; ROGÉRIO, J. S.; LINHARES, A. C. Meningite associada às infecções por vírus Oropouche. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.24, p.246-251, 1982a.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; GOMES, M. L. C.; LEDUC, J. W.; HOCK, A. L. Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. **Science**, v.215, p.1251-1253, 1982b.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; BENSABATH, G. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarém, Pará, Brazil. **Tropenmed. Parasitol.**, v.27, p.213-223, 1976.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; ISHAK, R.; FREITAS, R. B.; GOMES, M. L.; LEDUC, J. W.; OLIVAS, O. F. P. Oropouche virus I. A review of clinical, epidemiological and ecological findings. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.30, p.49-160, 1981a.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Arboviral zoonoses of Central and South America. Part G. Oropouche fever. In: Beran, G. W. **Handbook of zoonoses**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 214-217.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Febre por Oropouche. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Enfoque amazônico. Belém: CEJUP, 1997. p.285-298.
- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighbour countries. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries**, 1998. p.186-192.
- RAVCOV, E. V.; NICHOL, S. T.; COMPANS, R. W. Polarized entry and release in epithelial cells of black creek canal. **J. Virol.**, v.71, p.1147-1154, 1997.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg.**, v.27, p.493-497, 1938.

SAEED, M. F.; WANG, H.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F.; WEAVER, S. C.; SHOPE, R. E.; WATTS, D. M.; TESH, R. B.; BARRETT, A.D. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.743-748, 2000.

SANTOS, R. I. M. **Vírus oropouche**: estudo do mecanismo de entrada de células HeLa I e C6/36, 2003. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

SCHMALJOHN, C. S.; HOOPER, J. W. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.; et al. **Fundamental virology**. Philadelphia: Lipincott-Williams & Wilkins, 2001. p.1581-1602.

SHERLOCK, I. A.; GUITTON, N. Dermatozoonosis by culicoides bite idiptera: ceratopogonidae in Salvador, State of Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 62, p.145-159, 1964.

SMITH, J. F.; PIFAT, D.Y. Morphogenesis of sanfly viruses (*Bunyaviridae* family). **Virology**, v.121, p.61-81, 1982.

TESH, R. B. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.740, p.129-137, 1994.

TESH, R. B.; GUZMAN, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; DIAS, L. B.; BUNNELL, J. E.; ZHANG, H.; XIAO, S. Y. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocritus auratus*). Virologic, biochemical and immunologic studies. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.1431-1436, 2001.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Oropouche. **Médicos**, 1:64-67, 1998.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; RODRIGUES, S. G.; NUNES, M. R.; MAGALHÃES, M. T. F.; ROSA, J. S. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Epidemia de febre do oropouche em Serra Pelada, Município de Curionópolis, Pará, 1994. **Rev. Soc. Bras. Medic. Trop.**, v.29, p.537-541, 1996.

USHIJIMA, H.; KLIMAS, R.; KIM, S.; CASH, P.; BISHOP, D. H. Characterization of the viral ribonucleic acids and structural polypeptides of anopheles A, Bunyamwera, group C, California, Capim, Guama, Patois and Simbu bunyaviruses. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.29, p.1441-1452, 1980.

VAN TONGEREN, H. A. E. Occurrence of arboviruses belonging to the C-Bunyamwera and Guama groups, and of Oropouche, Junin, Tacaiuma and Kwatta viruses in man in the province of Brokopondo, Surinam. **Trop. Geogr. Med.**, v.19, p.309-325, 1967.

VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S.; GUERREIRO, S. C.; DÉGALLIER, N.; TRAVASSOS DA ROSA, E. S.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.31, p.271-278, 1989.

XIAO, S. Y.; ZHANG, H.; GUZMAN, H.; TESH, R. B. Experimental yellow fever virus infection in the golden hamster (*Mesocritus auratus*).II.Pathology. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.1437-1444, 2001a.

XIAO, S.Y.; GUZMAN, H.; ZHANG, H.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; TESH, R. B. West Nile virus infection in the golden hamster (*Mesocritus auratus*): A model for West Nile encephalitis. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, n.4, p.714-721, 2001b.

WATTS, D. M.; PHILLIPS, I.; CALLAHAN, J.; GRIEBENOW, W.; HYANS, K. C.; HAYES, C. G. Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.56, p.148-152, 1997.

WEIDMANN, M.; RUDAZ, V.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C.; HUFERT, F.T. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. **J. Clin. Microbiol.** 41(7):3299-3305, 2003.

WONG, K. T.; GROSJEAN, I; BRISSON, C.; BLANQUIER, B.; FEVRE-MONTANGE, M.; BERNARD, A.; LOTH, P.; GEORGES-COURBOT, M. C.; CHEVALLIER, M.; AKAOKA, H.; MARIANNEAU, P.; LAM, S. K.; WILD, T. F., DEUBEL, V. A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. **Am. J. Pathol.**, v.163, n.5, p.2127-2137, 2003.